



TITLE:

Genetic and physiological studies to discover novel anti-diabetic agents(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Takeshita, Shigeru

CITATION:

Takeshita, Shigeru. Genetic and physiological studies to discover novel anti-diabetic agents. 京都大学, 2016, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2016-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13016>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

京都大学	博士（工学）	氏名	竹下 滋
論文題目	Genetic and physiological studies to discover novel anti-diabetic agents （新規な糖尿病感受性遺伝子の探索、及び新規抗糖尿病薬候補物質の薬理作用に関する研究）		
<p>（論文内容の要旨）</p> <p>本論文は、遺伝学的手法を駆使して新規な糖尿病感受性遺伝子の特定を試みた研究（第一編：第一章～第三章）と、新規な抗糖尿病薬候補物質の薬理作用を検討した研究（第二編：第四章～第五章）をまとめたものであり、序論、本論二編五章、結論から構成されている。</p> <p>序論では、糖尿病の疾患や既存治療の背景紹介に加え、糖尿病に関する遺伝学的研究の進捗及び本研究の意義などがまとめられている。</p> <p>第一編では、第一章において糖尿病モデルマウスを用いた QTL（Quantitative Trait Loci）解析の結果をまとめた。QTL 解析は表現型に影響を及ぼす遺伝子座を特定するゲノムワイド解析として、糖尿病等の多因子性疾患において疾患感受性遺伝子を探索するための有用なアプローチである。本研究では、C57BL/6 系統の自然発症糖尿病モデルで高血糖、低インスリン血症を呈する Akita マウスと、遺伝子背景が異なる A/J マウスを用い、これら 2 系統の交配系により QTL 解析を試みた。Akita×A/J 交配の第一世代 F₁ 同士を交雑すると、Akita 型と A/J 型の染色体が多種多様に組み換わった第二世代 F₂ マウスが産生される。作製した 1000 匹超の F₂ マウスについて、表現型解析として糖負荷試験（GTT）における血糖値、インスリン値、体重等の評価し、遺伝子型解析として染色体マーカーを用いた全ゲノム遺伝子マッピングを実施して、QTL 解析ソフトウェア Map Manager QTX を用いた統計学的手法により、LOD（Logarithm of odds）スコアを指標にした遺伝子型と表現型の相関を解析した。その結果、対象の表現型に関連する染色体座が明らかとなり、そのうち 6 番、11 番、14 番及び 15 番染色体上で特定された QTL が、複数の表現型と有意に関連（LOD スコア≧4.3）することを示唆した。11 番、14 番及び 15 番染色体 QTL（それぞれ <i>Dbm2</i>、<i>Dbm3</i> 及び <i>Dbm4</i>）が空腹時及び糖負荷後血糖値と関連することを示唆したのに対し、6 番染色体 QTL（<i>Dbm1</i>）は血糖値と共にインスリン値や体重と関連することを示唆し、<i>Dbm1</i> には糖尿病のみならず肥満にも影響する疾患感受性遺伝子が潜在している可能性が考えられた。</p> <p>単独 QTL の病態表現型への寄与度を検証し、疾患感受性遺伝子候補を絞り込むには Congenic マウスの活用が効果的である。第二章では QTL 解析で多くの表現型への影響が示唆された <i>Dbm1</i> に着目し、Congenic マウスを作製して解析を行った。Akita×A/J 間の繰り返し戻し交配により、ゲノム全般の遺伝子背景が A/J 型で <i>Dbm1</i> 領域のみ Akita 型の遺伝子型である Congenic マウスと、対照として <i>Dbm1</i> も含めた全遺伝子背景が A/J 型の Control マウスを作製した。これら Congenic－Control 間で表現型（GTT）を比較することにより、糖尿病関連表現型と <i>Dbm1</i> 遺伝子型との関連を検討した結果、Akita 型の <i>Dbm1</i> 遺伝子型が血糖低下（耐糖能改善）や体重減少（内臓脂肪低下）に寄与することが示された。そこで、Congenic の表現型と遺伝子の関連を探索するため、<i>Dbm1</i> に存在する 14 遺伝子の機能検討を進めた。各遺伝子の発現組織分布や Akita－A/J 両系統間に存在する SNPs の情報、さらに Congenic における遺伝子発現解析の結果をもとにして、糖・脂質代謝関連の組織に発現する遺伝子で Akita－A/J 型間でアミノ酸配列や発現レベルが異なることが示唆された 3 つの候補遺伝子を絞り込んだ。続いて、Congenic 表現型</p>			

京都大学	博士（工学）	氏名	竹下 滋
<p>解析で <i>Dbm1</i> に存在する責任遺伝子が内臓脂肪蓄積に関与したことに着目し、候補 3 遺伝子の脂肪細胞あるいは筋肉細胞を用いた機能解析を進めた結果、<i>Bhlhe40</i> 遺伝子が筋肉細胞における脂肪酸酸化を負に制御していること示した。このことは筋肉中 <i>Bhlhe40</i> 発現が低い <i>Congenic</i> で脂肪酸酸化能が亢進していることを示唆しており、内臓脂肪が低下した表現型に合致していた。これらの結果より、<i>Bhlhe40</i> が <i>Dbm1</i> に存在する新規な糖尿病感受性遺伝子であることを示唆した。</p> <p>第三章では、QTL 解析で血糖値との関連が最も強く示唆された <i>Dbm4</i> (LOD スコア = 6.17) に着目し、<i>Congenic</i> マウスを作製して解析を行った。第二章研究と同様の手順により、ゲノム全般の遺伝子背景が A/J 型で <i>Dbm4</i> 領域のみ Akita 型の遺伝子型である <i>Congenic</i> マウスと、対照で A/J 型遺伝子背景の Control マウスとの間で表現型を比較検討した。GTT を実施した結果、Akita 型の <i>Dbm4</i> 遺伝子型が空腹時血糖の上昇に寄与することが示された。<i>Congenic</i> では Control と比較して肝臓の糖新生に関わる鍵酵素の発現レベルが有意に高かったことから、<i>Dbm4</i> に存在する疾患感受性遺伝子が肝糖新生関連遺伝子の発現を制御することにより空腹時血糖に影響を及ぼすことを示唆した。</p> <p>第二編では、第四章において新規バナジル錯体の抗糖尿病作用を検討した。VO(opt)₂ (Bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV)) を 2 型糖尿病モデル <i>ob/ob</i> マウスに反復経口投与したところ、血糖値、インスリン値及び中性脂肪値が低下し、耐糖能異常が改善した。3T3-L1 脂肪細胞において、VO(opt)₂ はインスリン刺激下の IRS-1 (Insulin receptor substrate-1) リン酸化を増強し、TNF-α (Tumor necrosis factor-α) 存在下で減弱したリン酸化 IRS-1 レベルを回復させた。<i>ob/ob</i> の脂肪組織では TNF-α が高発現であったことから、VO(opt)₂ が TNF-α により惹起されたインスリンシグナル伝達不良を軽減することにより、抗糖尿病作用を呈することを示唆した。</p> <p>第五章では、がん悪液質症候群に対するアルドース還元酵素阻害薬の作用を検討した。アデノカルチノーマ Colon26 細胞を皮下移植したマウスに対して ponalrestat を反復経口投与した結果、腫瘍重量には影響が見られなかったが、がん悪液質に伴う体重低下や脂肪・骨格筋の減少が有意に改善され、生存期間も延長した。また、リポ多糖 (LPS) による刺激下で上昇した IL-1 (Interleukin-1) を有意に抑制したことから、ponalrestat が IL-1 産生阻害を介してがん悪液質抑制作用を呈することを示唆した。</p> <p>結論では、本論文で得られた成果について要約している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、遺伝学的手法を用いた新規な糖尿病感受性遺伝子の探索研究、及び新規抗糖尿病薬候補物質の薬理作用に関する研究をまとめたものであり、その成果は以下のとおりである。

本論文の第一章では、遺伝学的手法としてマウス QTL 解析を行い、血糖値や体重等の量的表現型に影響を及ぼす染色体領域 (QTL) を全ゲノムにわたって探索した。その結果、6 番, 11 番, 14 番及び 15 番染色体で統計学的に有意に複数の表現型と関連する QTL (それぞれ *Dbm1*, *Dbm2*, *Dbm3* 及び *Dbm4*) が特定された。第二章では、第一章で血糖値のみならず血中インスリン値や体重にも関連する QTL として特定された *Dbm1* に着目し、更なる遺伝学的手法として Congenic マウス検討を行った。その結果、Cogenic 表現型解析より Akita 型の *Dbm1* 領域遺伝子型が血糖低下 (耐糖能改善) や体重減少 (内臓脂肪蓄積低下) に寄与することが示され、加えてバイオインフォマティクス技術やマウス表現型を外挿した遺伝子機能解析を駆使することにより、新規な糖尿病感受性遺伝子として *Bhlhe40* を特定した。また第三章では、第一章で統計学的に血糖値との関連が最も強く示唆された QTL である *Dbm4* に着目し、同様に Congenic マウス検討を実施したところ、*Dbm4* 領域には肝糖新生関連遺伝子の発現を制御する疾患感受性遺伝子が存在する可能性が示唆された。

第四章では、新規バナジル錯体の VO(opt)₂ について、*ob/ob* マウスを用いて抗糖尿病作用を検討した。その結果、新規バナジル錯体はインスリンシグナル伝達不良を軽減することにより、抗糖尿病作用を呈することが示唆された。第五章においては、アルドース還元酵素阻害薬 (ponalrestat) について検討し、がん悪液質抑制作用を有することを示唆した。

本論文は、2 型糖尿病の発症や治療のメカニズムに関する理解を大いに発展させたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 28 年 2 月 22 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。